

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

• **BLACK BORDERS**

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS

• **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**

- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**No English title available.**

Veröffentlichungsnr. (Sek.) DE19947616  
Veröffentlichungsdatum : 2001-05-03  
Erfinder : BRANDENBURG ALBRECHT (DE)  
Anmelder : FRAUNHOFER GES FORSCHUNG (DE)  
Veröffentlichungsnummer : ☒ DE19947616  
Aktenzeichen:  
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19991047616 19991004  
Prioritätsaktenzeichen:  
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19991047616 19991004; DE19991047316 19991001  
Klassifikationssymbol (IPC) : G01N21/64; G01N33/483; C12Q1/68  
Klassifikationssymbol (EC) : G01N21/64H, G01N21/77B  
Korrespondierende Patentschriften ☐ EP1218727 (WO0125759), ☐ WO0125759

---

**Bibliographische Daten**

---

The invention relates to a method and a device for determining substances, such as e.g., DNA sequences, in a sample. As the substances to be analysed contained in the sample react with complementary agents on a reaction support, they are also excited to the extent that they emit fluorescent light using the evanescent field of an excitation light. The reaction support has a planar light waveguide on its top surface. The immobilised complementary agents are located on said light waveguide and either the excitation light or the fluorescent light excited by the evanescent field of the same is guided in the planar light waveguide on the top surface of the reaction support, the fluorescent light being conveyed to a high-sensitivity resolution detector via a projection lens.

---

Daten aus der **esp@cenet** Datenbank - - I2

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 199 47 616 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**G 01 N 21/64**  
G 01 N 33/483  
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 199 47 616.0  
22 Anmeldetag: 4. 10. 1999  
43 Offenlegungstag: 3. 5. 2001

DE 199 47 616 A 1

66 Innere Priorität:  
199 47 316. 1 01. 10. 1999

71 Anmelder:  
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der  
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

74 Vertreter:  
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,  
80538 München

72 Erfinder:  
Brandenburg, Albrecht, 79232 March, DE

56 Entgegenhaltungen:

DE 197 32 619 C2  
DE 196 28 002 C1  
DE 35 32 563 C2  
DE 196 15 380 A1  
EP 6 71 622 A1  
EP 2 45 206 A1  
WO 96 09 532 A1

SPIE, Vol.1886, Fiber Optic Sensors in Medical  
Diagnostics, 1993, S.2-8;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Einrichtung zur Bestimmung von Substanzen, wie z. B. DNA-Sequenzen, in einer Probe

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Einrichtung zur Bestimmung von Substanzen, wie z. B. DNA-Sequenzen, in einer Probe, wobei gleichzeitig zu einer Reaktion der in der Probe enthaltenen, zu analysierenden Substanzen mit Komplementär-Agenzien auf einem Reaktionsträger eine Anregung derselben zur Fluoreszenz mittels des evaneszenten Feldes eines Anregungslichtes erfolgt und der Reaktionsträger auf seiner Oberseite einen planaren Lichtwellenleiter aufweist, auf dem sich die immobilisierten Komplementär-Agenzien befinden und entweder das Anregungslicht oder das durch das evaneszente Feld desselben angeregte Fluoreszenzlicht in dem planaren Lichtwellenleiter auf der Oberseite des Reaktionsträgers geführt werden, wobei das Fluoreszenzlicht über eine Abbildungsoptik einem ortsauflösenden Detektor zugeführt ist.

DE 199 47 616 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Einrichtung zur Bestimmung von Substanzen, wie z. B. DNA-Sequenzen, in einer Probe, wobei die Substanzen mit Meßpunkten, die durch mit den Substanzen reagierenden Komplementär-Agenzien, wie z. B. komplementären DNA-Einzelsträngen, gebildet werden, in Kontakt gebracht werden und unter Einstrahlung von Anregungslicht, insbesondere Laserlicht, ein Fluoreszenzlicht erzeugt wird, das über eine Erfassungseinrichtung ausgewertet wird.

Zur Bestimmung von Substanzen in Proben, insbesondere zur Feststellung bestimmter DNA-Sequenzen in einer Probe, ist die Verwendung von Biochips bekannt. Diese bilden planare Substratträger, auf deren Oberfläche eine Vielzahl von Meßpunkten, z. B. gebildet durch Nukleinsäuren (komplementäre DNA-Einzelstränge) immobilisiert sind, wobei diese Chipoberfläche mit einer die DNA-Sequenzen als zu analysierende Substanzen enthaltenden Probe in Kontakt gebracht werden und die Probe die zu analysierenden Nukleinsäuren enthält. Da jeder Einzelstrang eines Nukleinsäure-Moleküls mit seinem komplementären Strang eine Bindung eingeht, die als Hybridisierung bezeichnet wird, erhält man nach Prüfung der einzelnen Meßpunkte hinsichtlich der Anbindung von Probenmolekülen eine Aussage über die in der Probe vorhandenen DNA-Sequenzen. Einer der Vorteile der Biochip-Analytik besteht darin, daß bis zu einigen tausend Hybridisierungsereignissen parallel auf einem Biochip durchgeführt und detektiert werden können.

Entsprechend der Parallelität der Hybridisierungsereignisse ist ein Analysator zur Auswertung des Biochips erforderlich, der bei hoher Ortsauflösung eine ebenfalls hohe Nachweisempfindlichkeit erreicht. Da ein möglichst geringer Aufwand bei der Probenvorbehandlung getrieben werden soll, muß außerdem auch eine geringe Zahl von hybridisierten Molekülen an den einzelnen Meßpunkten noch zuverlässig erkannt werden.

Die Auswertungsproblematik wird z. B. aus der WO 96/35940 deutlich, bei der auf einem gemeinsamen Substrat eine Mehrzahl von zonaren Wellenleitern verwendet werden und die Sensoren in bestimmten Verteilungsmustern angeordnet sind (s. Fig. 3, Fig. 5).

Die vorliegende Erfindung zielt demgegenüber auf eine beträchtliche Vereinfachung im Aufbau des Reaktionsträgers, wie z. B. eines Biochips, sowie in der zugehörigen Analysevorrichtung (optischer Detektor) ab.

Kommerziell erhältliche Biochip-Reader arbeiten nach dem Scanning-Prinzip. Das Anregungslicht zur Anregung der Fluoreszenz tastet hierbei die Oberfläche seriell ab. Entweder wird bei feststehendem Lichtstrahl der Biochip schnell bewegt oder es wird, zumindest für eine Bewegungsrichtung, ein Galvano-Scanner eingesetzt, mit dem der Lichtstrahl abgelenkt wird. Das von den Fluorochromen emittierte Licht wird dann mit einem empfindlichen Fotodetektor, z. B. einem Foto-Multiplier, nachgewiesen. Derartige Geräte sind als Labormesssysteme für Anwendungen in der molekularbiologischen Forschung ausgelegt. Das Detektionslimit liegt im Bereich von wenigen Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  bis zu ca.  $100 \mu\text{m}^2$ . Die Scannzeiten liegen bei ca. 2 bis 4 Minuten.

Den bekannten Meßgeräten ist gemeinsam, daß sie den Biochip (allein) nach abgeschlossener Hybridisierung auswerten. Eine in-situ-Erfassung der Reaktion (Hybridisierung) zwischen den DNA-Sequenzen in der Probe und den komplementären DNA-Einzelsträngen auf dem Biochip ist dabei nicht möglich.

Für eine Reihe von Anwendungen ist es aber auch interessant, den zeitlichen Verlauf der Hybridisierung direkt zu

beobachten. Dies ist mit den vorerläuterten, im praktischen Einsatz befindlichen Geräten nicht möglich, da in allen Fällen die an der Oberfläche gebundenen Fluorochrome von der Chipoberseite beleuchtet werden. Die Echtzeit-Messung erfordert im Gegensatz dazu eine Detektion in Anwesenheit der Probe. Die Probe mit den Substanzen, insbesondere DNA-Sequenzen (es sind aber auch andere biologische oder chemische Substanzen in gleicher Weise durch Beobachtung der Reaktion mit Komplementär-Agenzien auf dem Reaktionsträger nachweisbar) kann sich z. B. in einer Flußzelle auf der Oberseite des Biochips befinden.

Eine Einstrahlung des Anregungslichtes durch die Flußzelle hindurch oder von der Unterseite des Biochips her würde wegen der Anregung von Fluorochromen in der Probe eine sehr hohe Untergrundintensität erzeugen und damit die Auswertung der Reaktion auf der Oberseite des Biochips, die mit hoher Ortsauflösung erfolgen muß, beträchtlich erschweren oder gar unmöglich machen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Einrichtung der eingangs genannten Art zu verbessern derart, daß in einfacher Weise und ohne hohe Anforderungen an die Probenvorbehandlung eine präzise Detektion von Substanzen in einer Probe mit Hilfe eines Reaktionsträgers mit hoher Ortsauflösung erfolgen kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, bei dem die Substanzen mit Meßpunkten auf einem planaren Lichtwellenleiter eines Reaktionsträgers, insbesondere eines Biochips, in Kontakt gebracht werden, wobei diese Meßpunkte durch mit den Substanzen reagierende Komplementär-Agenzien gebildet sind, die dort immobilisiert sind und wobei die Anregung von an die Substanzen und/oder Komplementär-Agenzien gebundenen, fluoreszierenden Farbstoffen zur Emission von Fluoreszenzlicht durch das evaneszente Feld des in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelten Anregungslichtes erfolgt, wobei eine Detektion des Fluoreszenzlichtes in der Umgebung des Reaktionsträgers erfolgt oder das Anregungslicht aus der Umgebung des Reaktionsträgers diesen beleuchtet und im letzteren Falle das im Bereich des Evaneszentfeldes des Anregungslichtes befindliche Fluoreszenzlicht, emittiert von den an der Oberfläche des planaren Lichtwellenleiters gebundenen fluoreszierenden Stoffen in den Lichtwellenleiter eingekoppelt und in diesem geführt sowie zu einem Detektor geleitet wird.

Ein solches Verfahren ermöglicht eine sehr einfache Auslegung des Reaktionsträgers, insbesondere Biochips, durch Beschichten eines transparenten Körpers mit einer hochbrechenden planaren Wellenleiterschicht und gestattet eine einfache Analysevorrichtung, bei der z. B. eine die Probe enthaltende Flußzelle (oder eine Küvette oder sonstiger stationärer Probenkörper) in abdtierenden Oberflächenkontakt mit dem Reaktionsträger, insbesondere Biochip, gebracht wird, dessen Oberfläche zumindest im wesentlichen als planarer Wellenleiter ausgebildet ist und das Anregungslicht, das an einem Ende des planaren Wellenleiters in diesen eingekoppelt wird, führt, wobei das vom evaneszenten Feld des Anregungslichtes angeregte Fluoreszenzlicht durch den transparenten Trägerkörper hindurch an der dem planaren Wellenleiter und der Flußzelle gegenüberliegenden Seite des Reaktionsträgers bzw. Biochips durch eine, vorzugsweise einen Filter enthaltende Abbildungsoptik erfaßt und einem zugehörigen ortsauflösenden Detektor, z. B. einem Foto-Multiplier oder einer CCD-Kamera zum Auslesen des Reaktionsträgers, insbesondere Biochips, zugeführt wird.

Hierbei werden sämtliche Meßpunkte auf der Oberseite des planaren Wellenleiters des Reaktionsträgers bzw. Biochips gleichzeitig durch das evaneszente Feld des in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelten Anregungslichtes

zur Fluoreszenzlichtemission in Verbindung mit einer Reaktion zwischen den immobilisierten Agenzien auf der Chip-Oberfläche, wie z. B. DNA-Einzelsträngen und den nachzuweisenden Substanzen in der Probe, wie z. B. den DNA-Sequenzen, angeregt.

In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsge-  
mäßigen Verfahrens kann das Anregungslicht auch von der  
Umgebung, z. B. der Gegenseite des Reaktionsträgers, wie  
z. B. Biochips, her durch einen transparenten Abschnitt des-  
selben in den Wellenleiter im möglichen Reaktionsbereich  
zwischen den die Meßpunkte bildenden Agenzien auf der  
Oberfläche des planaren Wellenleiters und den Substanzen  
in der Probe eingestrahlt werden, wobei zwar alle, d. h. auch  
die gelösten und die gebundenen Fluorochrome durch das  
Anregungslicht zur Fluoreszenz angeregt werden, jedoch  
nur das von den nahe der Oberfläche des planaren Lichtwellenleiters gebundenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelt wird und in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelt wird und das in dem planaren Wellenleiter geführte Fluoreszenzlicht an zumindest einer Seite des Lichtwellenleiters z. B. über eine einen Filter enthaltende Abbildungsoptik ausgelesen und z. B. einem Foto-Multiplier als Detektor zugeführt wird. Es könnte jedoch auch ein Detektor mit der Endfläche des Lichtwellenleiters (ohne Abbildungsoptik) gekoppelt werden. Es könnte jedoch auch ein Detektor direkt mit der Endfläche (Chipkante) gekoppelt werden, vorzugsweise unter Vermittlung eines Interferenzfilters.

In diesem Fall wird eine linienmäßige Erfassung der Meßpunkte (Scannen durch eine Scanneinrichtung) unter Bewegung des Reaktionsträgers bzw. Biochips bzw. des eingestrahlichten Anregungslichtes relativ zueinander vorgenommen.

Die vorgenannte Aufgabe wird ferner durch eine Einrichtung der eingangs genannten Art gelöst, bei der der Reaktionsträger, insbesondere Biochip, an seiner Oberseite einen planaren Lichtwellenleiter, auf dem sich Meßpunkte mit Komplementär-Agenzien befinden, aufweist, wobei sich die hochbrechende Schicht des planaren Wellenleiters vorzugsweise auf einem transparenten Körper erstreckt und die Komplementär-Agenzien vorgesehen sind, um mit Substanzen in einer Probe, die auf den planaren Wellenleiter aufbringbar ist, in Interaktion zu treten, und wobei Anregungslicht zur gleichzeitigen Anregung der Meßpunkte entweder in den planaren Lichtwellenleiter zur Anregung von Fluoreszenzlicht eingekoppelt und in diesem geführt wird, wobei das durch das evaneszente Feld des eingekoppelten Anregungslichtes angeregte Fluoreszenzlicht vorzugsweise einer Auswerteoptik in der Umgebung des planaren Wellenleiters, insbesondere an der gegenüberliegenden Seite des Reaktionsträgers sowie einem mit dieser verbundenen ortsauflösenden Detektor zugeführt ist, oder wobei der planare Lichtwellenleiter mit dem Anregungslicht bestrahlt wird und das im Bereich des Evaneszentfeldes emittierte Fluoreszenzlicht der nahe der Oberfläche des Wellenleiters verbindlichen Fluorochrome in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelt und in diesem geführt sowie einer an diesen angeschlossenen Erfassungseinrichtung, z. B. über eine Auswerteoptik und einen Detektor erfassbar ist.

Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß die Anregung der gebundenen, die Anwesenheit der zu detektierenden Substanz signalisierenden Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht entweder durch das Evaneszentfeld des in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelten und in diesem geführten Anregungslichtes erfolgt, wobei das emittierte Fluoreszenzlicht dann entweder oberhalb oder unterhalb des planaren Lichtwellenleiters, gegebenenfalls über eine Auswerteoptik und einen Filter durch einen ortsauflö-

senden Detektor erfaßt wird oder aber in umgekehrter Weise die Anregung der gebundenen Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht durch frei in Richtung auf das Meßfeld aus der Umgebung des Lichtwellenleiters auf diesen gestrahltes Anregungslicht erfolgt (wobei sämtliche Fluorochrome – auch die nicht gebundenen – angeregt werden), jedoch nur dann das Fluoreszenzlicht der gebundenen Fluorochrome, das im Bereich des Evaneszentfeldes des Anregungslichtes liegt, in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelt und in diesem dann das Fluoreszenzlicht geführt und einer Detektion entweder über eine Auswerteoptik oder auch direkt am Ende des planaren Lichtwellenleiters zugeführt wird, wobei eine Scanneinrichtung vorgesehen ist, um eine Relativbewegung zwischen dem Anregungslichtstrahl und den Meßpunkten in zwei Achsen hervorzuufen.

Die eine Methode ist praktisch die Umkehrung der anderen, da entweder das Anregungslicht in dem planaren Lichtwellenleiter geführt wird oder das emittierte Fluoreszenzlicht der gebundenen Fluorochrome in dem planaren Lichtwellenleiter geführt wird.

Weitere, bevorzugte Ausgestaltungen des Erfindungsgegenstandes sind in den übrigen Unteransprüchen dargelegt.

Durch die Erfindung ist eine einfache "in-situ"-Auslesung von Reaktionsträgern, insbesondere von Biochips zur Erfassung von DNA-Sequenzen, die mit auf der Oberfläche des Biochips, d. h. des planaren Wellenleiters immobilisierten komplementären DNA-Einzelsträngen kombinieren (hybridisieren) möglich, wobei die Anregung der gebundenen Fluorochrome durch das evaneszente Feld des Anregungslichtes zu einer erhöhten Auswertesicherheit und Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit der Detektion führt.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen und zugehörigen Zeichnungen näher erläutert. In diesen zeigen:

Fig. 1a einen Biochip in schematischer perspektivischer Darstellung,

Fig. 1b einen Ausschnitt des Biochips nach Fig. 1a für einen Meßpunkt einer Oberfläche mit immobilisierten DNA-Einzelsträngen,

Fig. 1c eine schematische Darstellung der Zugabe der Probe mit den zu analysierenden DNA-Sequenzen zu dem Meßpunkt nach Fig. 1a und Darstellung der komplementären Interaktion zwischen den immobilisierten DNA-Einzelsträngen nach Fig. 1b und den in der Probe enthaltenen DNA-Sequenzen (Hybridisierung),

Fig. 2 eine schematische Darstellung eines planaren Wellenleiters mit Intensitätsverteilung des geführten Lichtes sowie auf dessen Oberfläche befindlichen immobilisierten DNA-Einzelsträngen,

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer Meß- oder Analyseeinrichtung zum Auslesen eines Biochips nach einem ersten Ausführungsbeispiel und

Fig. 4 eine schematische Darstellung einer Einrichtung zum Auslesen eines Biochips nach einem weiteren Ausführungsbeispiel.

Als Ausführungsbeispiel des Verfahrens und der Einrichtung, die den Gegenstand der vorliegenden Patentanmeldung bilden, wird die Gestaltung und das Auslesen eines Biochips gewählt, wie er für die Analyse von DNA-Sequenzen, die sich in einer Probe befinden und zur Analyse der Nukleinsäuren mit einer Oberfläche eines Biochips in Kontakt gebracht werden, verwendet wird.

Selbstverständlich ist dies nur ein Ausführungsbeispiel und können hier auch andere molekularbiologische, biologische und/oder chemische Substanzen, wie z. B. Gene und Antikörper detektiert werden.

In Fig. 1a ist in schematischer Darstellung ein solcher Biochip 1 gezeigt, der ein kleines Plättchen bildet, auf des-

sen Oberfläche eine Vielzahl von Nukleinsäuren 11 in einzelnen Meßpunkten 10 immobilisiert sind. An jedem einzelnen Meßpunkt 10 befindet sich ein Oligonukleotid mit einer definierten Basensequenz. Dies ist in Fig. 1b dargestellt. In Fig. 1c sind die zu analysierenden Nukleinsäuren der zu untersuchenden Probe mit 12 bezeichnet und durch einen Pfeil ist angedeutet, daß diese in Kontakt gebracht werden, mit den komplementären Nukleinsäuren 11, die sich im Meßpunkt 10 befinden. Da jeder Einzelstrang eines Nukleinsäuremoleküls 11 mit seinem komplementären Strang 12 (s. Fig. 1b) eine Bindung eingeht (Hybridisierung), erhält man nach Prüfung der einzelnen Meßpunkte 10 hinsichtlich der Anbindung von Probenmolekülen 12 eine Aussage über die in der Probe vorhandenen DNA-Sequenzen 12. Die hybridisierten DNA-Sequenzen sind in Fig. 1c mit 13 bezeichnet.

Fig. 2 verdeutlicht schematisch die Ausbildung des Biochips 1, bestehend aus einem transparenten Grundkörper 1a und einem planaren Lichtleiter 1b, der die hochbrechende, lichtleitende Schicht auf dem transparenten Substrat 1a bildet.

In dieser Darstellung ist die Einkopplungsvorrichtung für das geführte Anregungslicht nicht gezeigt. Auf der Oberseite des Lichtwellenleiters 1b befinden sich die Meßpunkte 10, gebildet durch die komplementären DNA-Einzelstränge 11. Die zu detektierenden DNA-Sequenzen 12 der Probe sind mit Fluorochromen, d. h. fluoreszierenden Farbstoffen, markiert, so daß immer dann, wenn diese mit dem auf dem planaren Lichtwellenleiter 1b immobilisierten, komplementären DNA-Strang 11 hybridisieren, eine Markierung dieser Hybridisierung auf der Oberfläche des planaren Lichtwellenleiters 1b erfolgt.

Es ist jedoch auch möglich, die immobilisierten komplementären Einzelstränge 11, die den Meßpunkt 10 bilden, fluoreszenzfarblich zu markieren. Nach Hybridisierung werden die so gebundenen Fluorochromen z. B. durch das evaneszente Feld von in dem planaren Lichtwellenleiter 1b geführten Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Da die Intensität des Evaneszenzfeldes in einem Abstand von ca. 50 nm auf die Hälfte des Wertes an der Wellenleiteroberfläche abgefallen ist, werden nahezu ausschließlich die an der Oberfläche angebondenen Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen. Die Intensitätsverteilung des geführten Lichtes ist in Fig. 2 mit 2 bezeichnet.

Es sind jedoch auch stationäre Substanzbereitstellungen in Küvetten oder Probenbehältern möglich.

Mit der Anregung der Meßpunkte 10 durch Einkopplung von Anregungslicht in den planaren Lichtwellenleiter 1b gemäß Fig. 2 wird eine gleichzeitige Anregung sämtlicher Meßpunkte 10 erreicht.

Fig. 3 zeigt in schematischer Darstellung eine Einrichtung zum Auslesen eines Biochips 1, der eine Konfiguration aufweist, wie sie in Fig. 2 dargestellt ist. Der Biochip 1 besteht wiederum aus dem transparenten Substrat 1a und der auf das Substrat aufgetragenen hochbrechenden Beschichtung als planarer Lichtwellenleiter 1b. Die Ränder 1c des Biochips 1 bleiben außerhalb der Wellenleiterstruktur. Der Lichtwellenleiter trägt ein Feld von Meßpunkten 10 und das Anregungslicht 4 wird über ein Koppelgitter 5 in den Lichtwellenleiter 1b eingekoppelt und in diesem geführt. Die Meßpunkte 10 sind so ausgebildet, wie dies anhand der Fig. 1b und Fig. 2 erläutert wurde. Zur Analyse von DNA-Nukleinsäuren in einer Probe wird diese Probe hier beispielsweise in einer Flußzelle 6 und durch diese hindurchgeführt, wie dies durch die Strömungspfeile 6a, 6b angedeutet ist. Die Flußzelle 6 wird abgedichtet auf den Lichtwellenleiter 1b aufgesetzt und umgibt das Meßfeld mit den Meßpunkten 10 rahmenartig und fluiddicht, so daß die Probe mit allen Meßpunkten 10 zur möglichen Hybridisierung in Wechsel-

wirkung treten kann. Die Detektion der durch das Evaneszenzfeld des Anregungslichtes angeregten Fluoreszenzstrahlung 7 erfolgt z. B. mittels einer Abbildungsoptik 8 in Verbindung mit einem (hier nicht gezeigten) Filter und einem ortsauflösenden Detektor 9, wie z. B. einer DDC-Kamera oder einem Foto-Multiplier. Die Detektion kann aber auch durch Abstrahlung des Fluoreszenzlichtes nach oben oberhalb des Wellenleiters 1b erfolgen.

Auf diese Weise ist eine "in-situ-Erfassung" der Hybridisierung und eine parallele Auslesung des Biochips 1 mit allen Meßpunkten 10 gleichzeitig möglich. Zugleich erfolgt eine selektive Anregung der gebundenen Fluorochrome in den Meßpunkten. Durch dieses Meßprinzip ist daher ohne besondere Probenvorbereitung eine mit großer Genauigkeit hinsichtlich der Ortsauflösung und auch hinsichtlich der Präsenz von hybridisierten Nukleinsäuren eine sehr schnelle Auswertung und Detektion des Biochips 1 möglich.

Bekanntermaßen muß bei einer Analysenanordnung nach Fig. 3 zusätzlicher Aufwand für die Einkopplung des Anregungslichtes 4 in den Wellenleiter 1b (hier über ein Gitter 5) getrieben werden. Einerseits werden somit zusätzliche Präparationsschritte bei der Herstellung des Biochips 1, andererseits sind Justiervorrichtungen in der optischen Anordnung zwischen Anregungslichtquelle (Laserquelle) und Biochip erforderlich. Die damit einhergehende Erhöhung der Biochipkosten, die als Verbrauchsmaterial problematisch ist, kann dadurch vermieden werden, daß eine Meß- und Analysenanordnung nach der schematischen Darstellung gemäß Fig. 4 verwendet wird, bei der eine Anregung der Fluoreszenz auf der Oberseite des Lichtwellenleiters 1b z. B. von der Rückseite des Biochips 1 und damit von der gegenüberliegenden Seite in Bezug auf die Flußzelle 6 erfolgt, aber eine Detektion des von den gebundenen Fluorochromen emittierten Fluoreszenzlichtes durch Einkopplung desselben in den planaren Wellenleiter 1b vorgesehen wird.

Zur Lösung wird das von einer Laserstrahlquelle emittierte Anregungslicht vorzugsweise über eine Ablenkeinheit 14 auf einen Umlenkspiegel 15 und von dort in den Wellenleiter 1b im Bereich des Meßfeldes der Meßpunkte 10 geführt, an dem sich z. B. die Flußzelle 6 befindet. Hierbei findet mit einer Scanneinrichtung eine zweiachsige Relativbewegung zwischen Anregungslichtstrahl und Biochip statt. Auch in diesem Fall wird durch den planaren Wellenleiter 1b eine Trennung von angebondenen und gelösten Fluorochromen erreicht, da nur das im Bereich des Evaneszenzfeldes des Anregungslichtes 4 emittierte Fluoreszenzlicht 7 auch in den planaren Wellenleiter 1b eingekoppelt und anschließend detektiert wird. Die gelösten Fluorochrome erzeugen keine Untergrundintensität, da dieses Licht nicht an die Erfassungseinrichtung herangeführt wird, sondern nur das in dem planaren Wellenleiter 1b geführte Fluoreszenzlicht der gebundenen Fluorochrome. Die Strömungspfeile 6a, 6b geben wiederum den Probenfluß durch die Flußzelle 6 an, während die Abbildungsoptik 8 mit Filter im Anschluß an den planaren Lichtwellenleiter 1b dargestellt ist, wobei als ortsauflösender Detektor hier ein Foto-Multiplier verwendet wird.

Da bei diesem Ausführungsbeispiel eine zeilenweise Auslesung erfolgen muß, wird der Biochip 1 in Pfeilrichtung A, wie angegeben, entsprechend bewegt.

Gegebenenfalls kann auch auf der anderen Seite des Wellenleiters eine Erfassungseinrichtung mit Auswertoptik, Filter und Foto-Multiplier zur Erfassung des auf der anderen Seite aus dem Lichtwellenleiter 1b austretenden Fluoreszenzlichtes vorgesehen sein oder der Detektor kann direkt an die Kante des Lichtwellenleiters 1b angekoppelt sein.

Als Lichtwellenleiter kann auch unmittelbar eine Glasplatte verwendet werden, die selbst den Reaktionsträger und

zugleich planaren Lichtwellenleiter bildet. In diesem Fall kann eine separate, den Lichtwellenleiter bildende Beschichtung eines Substrats entfallen.

Die erfindungsgemäße Lösung gestattet die Real-Time-Messung und Auswertung von Biochips oder auch von anderen Reaktionsträgern, auf deren mit einem planaren Wellenleiter beschichteten Oberseite durch Reaktion Analysen von Substanzen in Proben bewirkt werden.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Einrichtung zur Bestimmung von Substanzen, wie z. B. DNA-Sequenzen, in einer Probe, wobei gleichzeitig zu einer Reaktion der in der Probe enthaltenen, zu analysierenden Substanzen mit Komplementär-Agenzien auf einem Reaktionsträger eine Anregung derselben zur Fluoreszenz mittels des evaneszenten Feldes eines Anregungslichtes erfolgt und der Reaktionsträger auf seiner Oberseite einen planaren Lichtwellenleiter aufweist, auf dem sich die immobilisierten Komplementär-Agenzien befinden und entweder das Anregungslicht oder das durch das evaneszente Feld desselben angeregte Fluoreszenzlicht in dem planaren Lichtwellenleiter auf der Oberseite des Reaktionsträgers geführt werden, wobei das Fluoreszenzlicht vorzugsweise über eine Abbildungsoptik einem zugeführt ist.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Substanzen (12), wie z. B. DNA-Sequenzen, in einer Probe, wobei die Substanzen (12) mit Meßpunkten (10) auf einem planaren Lichtwellenleiter (1b) eines Reaktionsträgers (1), wie z. B. eines Biochips, gebildet durch mit den Substanzen (12) reagierenden Komplementär-Agenzien (11), wie z. B. komplementären DNA-Einzelsträngen, in Kontakt gebracht werden und die Komplementär-Agenzien (11) auf der Oberfläche des planaren Lichtwellenleiters (1b) des Reaktionsträgers (1) immobilisiert sind und die Anregung von an die Substanzen (12) und/oder Komplementär-Agenzien (11) gebundenen, fluoreszierenden Farbstoffen im Bereich der Oberfläche des planaren Wellenleiters (1b) zur Emission von Fluoreszenzlicht (7) durch das evaneszente Feld von in den planaren Lichtwellenleiter (1b) eingekoppeltem Anregungslicht (4) und Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes in der Umgebung des Lichtwellenleiters (1b) oder durch Anregungslicht (4) aus der Umgebung des planaren Lichtwellenleiters (1b) erfolgt, wobei das von den gebundenen fluoreszierenden Farbstoffen emittierte Fluoreszenzlicht im Bereich des evaneszenten Feldes des Anregungslichtes in den planaren Lichtwellenleiter eingekoppelt und durch den Lichtwellenleiter (1b) einem Detektor zugeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht (4) in den planaren Wellenleiter (1b) mittels einer optischen Einrichtung, wie z. B. einem Gitter (5), eingekoppelt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Sequenzen (12) mit komplementären DNA-Einzelsträngen (11) auf dem planaren Lichtwellenleiter (1b) hybridisieren und unter Anregung durch das Evaneszenzfeld des Anregungslichtes (4) das Fluoreszenzlicht (7) emittieren, das in der Nähe des Lichtwellenleiters (1b) detektiert wird, oder unter dem Einfluß von zu dem Lichtwellenleiter gestrahltem Anregungslicht (4) Fluoreszenzlicht emittieren, das im Bereich des Evaneszenzfeldes des Anregungslichtes in den planaren Lichtwellenleiter (1b) eingekoppelt und in diesem zu dem Detektor (9) geführt wird.

4. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe des in den planaren Lichtwellenleiter (1b) eingekoppelten Anregungslichtes (4) eine gleichzeitige Anregung aller Meßpunkte (10) erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzlicht (7) der zu den DNA-Sequenzen (12) in der Probe komplementären DNA-Einzelstränge (11) vorzugsweise mittels einer einen Filter (8a) enthaltenden Abbildungsoptik einem ortsauflösenden Detektor (9) oberhalb oder unterhalb des Biochips (1) oder auf der Seite zum Auslesen des Biochips (1) zugeführt wird.

6. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht (4) von einer Rückseite des Reaktionsträgers, insbesondere Biochips (1), eingestrahlt und das vom Anregungslicht (4) angeregte Fluoreszenzlicht (7) in dem im Bereich des evaneszenten Feldes des Anregungslichtes planaren Lichtwellenleiter (1b) eingekoppelt und geführt und zumindest einem Detektor (9) vorzugsweise nach Durchgang durch einen Filter (8a) enthaltende Abbildungsoptik (8) zugeführt wird.

7. Einrichtung zur Analyse einer Probe auf Substanzen (12) mit einem Reaktionsträger (1), insbesondere Biochip, dessen Oberfläche mit den Substanzen (12) reagierende Komplementär-Agenzien (11) aufweist, die Meßpunkte (10) auf einem planaren Lichtwellenleiter (1b) des Reaktionsträgers (1) bilden, mit einer Lichtquelle (3) zur Einkopplung eines Anregungslichtes (4) in den planaren Lichtwellenleiter (1b) oder zur Beleuchtung des Lichtwellenleiters (1b) aus der Umgebung desselben, zur Anregung der Emission eines Fluoreszenzlichtes (7) von Fluorochromen in Abhängigkeit von der Reaktion der Substanzen (12) der Probe mit den Komplementär-Agenzien (11) des Reaktionsträgers (1) und mit einem Detektor (9) zum Erfassen des von den auf der Oberfläche des Lichtwellenleiters (1b) gebundenen Fluorochromen emittierten Fluoreszenzlichtes entweder nach Einkopplung und Führung desselben in dem planaren Lichtwellenleiter oder nach Emission des Fluoreszenzlichtes, angeregt von in dem Wellenleiter geführten Anregungslicht in die Umgebung des Lichtwellenleiters (1b) durch einen ortsauflösenden Detektor angeordnet in der Umgebung des planaren Lichtwellenleiters (1b).

8. Einrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht (4) in eine Endfläche des planaren Wellenleiters (1b) eingekoppelt ist.

9. Einrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht (4) über eine Koppelungseinrichtung, insbesondere ein Koppelgitter (5), in den planaren Lichtwellenleiter (1b) eingekoppelt ist.

10. Einrichtung nach zumindest einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (9) vorzugsweise unter Einsatz eines Filters (8a) entweder oberhalb oder unterhalb des Reaktionsträgers (1), insbesondere Biochips, vorgesehen ist.

11. Einrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (9) zur Erfassung des in dem planaren Lichtwellenleiter (1b) geführten Fluoreszenzlichtes (7) an einer Endfläche des planaren Lichtwellenleiters (1b), vorzugsweise unter Vermittlung einer einen Filter (8a) enthaltenden Abbildungsoptik (8) oder direkt an einer Kante des Reaktionsträgers, insbesondere Biochips, angeordnet ist.

12. Einrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe durch eine Flußzelle (6) geführt oder stationär in einer Küvette oder einem Probenbehälter in abdichtender Verbindung im Bereich der Meßpunkte auf der Oberfläche des planaren Lichtwellenleiters (1b) des Reaktionsträgers (1) vorgesehen ist. 5

13. Einrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionsträger ein Biochip (1) mit einem planaren Lichtwellenleiter (1b) auf seiner Oberseite ist, der die Meßpunkte (10) trägt. 10

14. Einrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionsträger (1) eine Glasplatte ist, die selbst den planaren Lichtwellenleiter (1b) bildet. 15

15. Einrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 7 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht (4) von einer Ober- oder Unterseite des Reaktionsträgers (1), insbesondere Biochips, her auf diesen fällt und daß von den an der Oberfläche des planaren Lichtwellenleiters (1b) gebundenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht (7) im Bereich des evaneszenten Feldes des Anregungslichtes (4) in den planaren Lichtwellenleitern (1b) eingekoppelt und in diesem geführt und durch die Erfassungseinrichtung (8, 9), die an zumindest einer Endfläche des planaren Lichtwellenleiters (1) angeordnet ist, erfaßbar ist. 20 25

16. Einrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassungseinrichtung vorzugsweise eine Abbildungsoptik (8) mit einem Filter (8b) sowie einen Detektor (9), z. B. Foto-Multiplier oder CCD-Kamera, aufweist. 30

17. Einrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 7 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine Scanneinrichtung zum Auslesen des Reaktionsträgers (1), insbesondere Biochips, vorgesehen und der Reaktionsträger (1) und/oder das Anregungslicht aus der Umgebung des Reaktionsträgers (1) relativ zu diesem in zumindest einer Ebene bewegbar ist. 35 40

---

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---

45

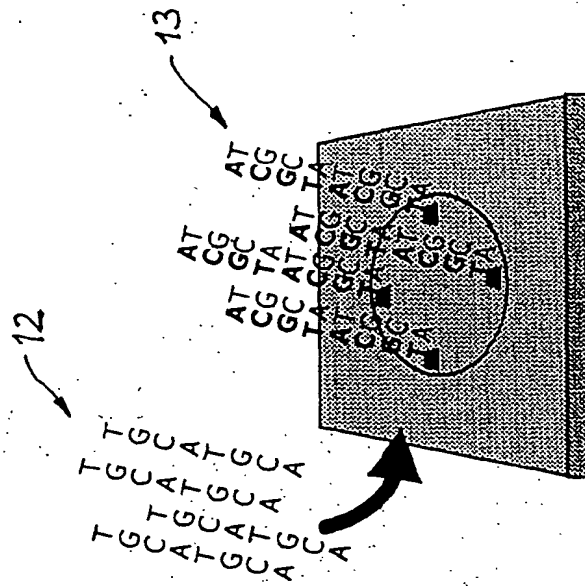
50

55

60

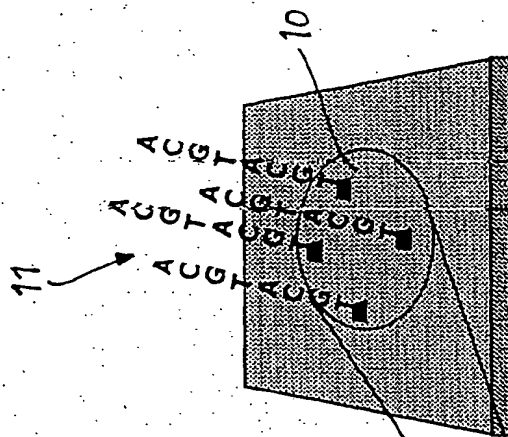
65





Zugabe der Probe und  
Hybridisierung

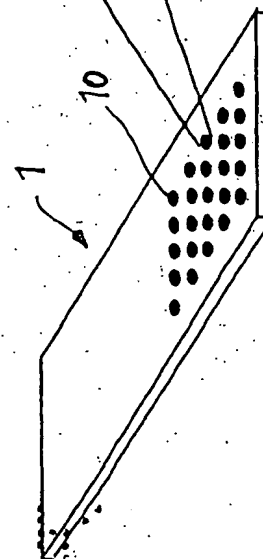
Fig. 1c



Oberfläche mit  
immobilisierten  
DNA-Einzelsträngen

Fig. 1b

Fig. 1



Biochip

Fig. 1a

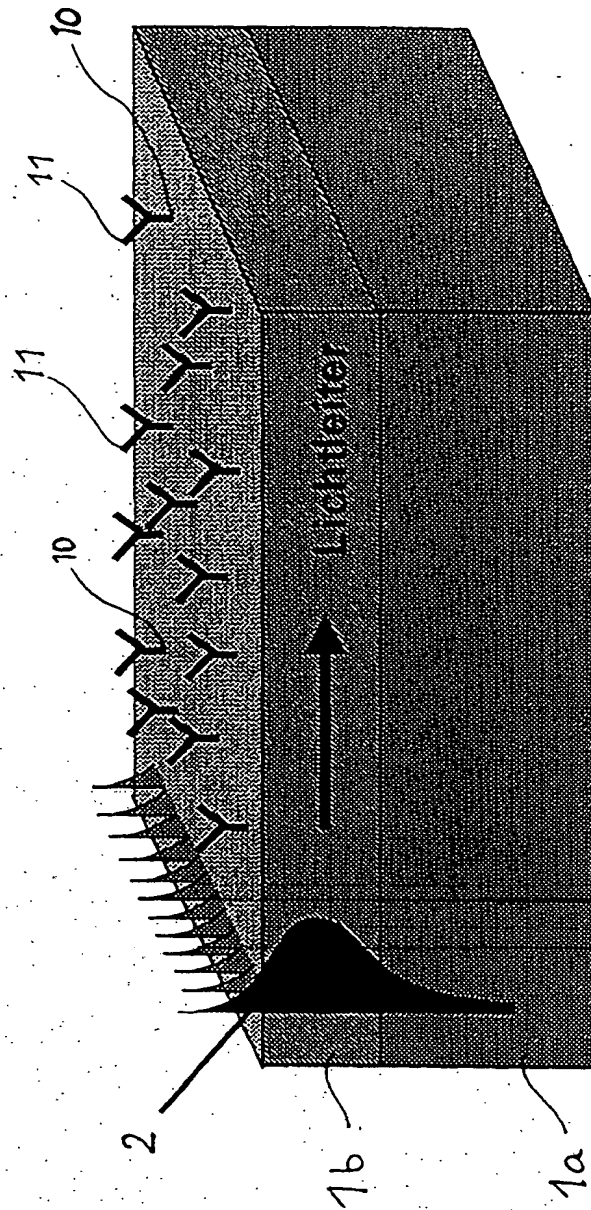


Fig. 2

Fig. 3

